

# 各種自己免疫疾患及び造血器腫瘍患者に出現する 胎盤絨毛ジンチチオトロホプラスト基底膜面と 反応する血清抗体—その特異性と臨床的意義

米 沢 和 彦 前 田 修 一

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

## Serum Antibody Reacting with the Basal Aspect of Syncytiotrophoblast Detected in Autoimmune Diseases and Hematological Malignancies —Specificity of the Antibody and the Clinical Significance

Kazuhiko YONEZAWA and Shuichi MAEDA

*Department of Internal Medicine (Section I), Sapporo Medical College  
(Chief : Prof. A. Yachi)*

Antibody activity against the basal aspect of syncytiotrophoblast of normal human chorionic villi (anti-BAST) was investigated by using immunohistological and immunoblotting (Western-blotting) methods. The possibility that the antigens recognized by this antibody might be human retrovirus-related antigens was also examined. The following results were obtained;

1. IgM antibody which reacted with the basal aspect of syncytiotrophoblast (BAST) of normal human chorionic villi was demonstrated in the sera of patients with hematological malignancies and autoimmune diseases.

2. Immunofluorescent absorption and blocking tests revealed that anti-BAST crossreacted with SSAV and semi-purified retrovirus fraction of human term placenta (obtained at the sucrose concentration of 1.15–1.17 g/ml by the density gradient ultracentrifugation).

3. Western-blotting analysis revealed that one of the corresponding antigens to anti-BAST, which had a molecular weight of about 30,000 daltons, was not bound to Lentil-lectin, while the others with molecular weights of about 90,000 daltons were bound to Lentil-lectin.

4. The frequency of the detection of anti-BAST was significantly high in AML, ALL, malignant lymphoma, SLE, ITP, RA and AIHA. The high titers of anti-BAST were observed in cases with AML, ALL, malignant lymphoma and SLE.

### Abbreviation

AIHA	: autoimmune hemolytic anemia	FeLV	: feline leukemia virus
ALL	: acute lymphocytic leukemia	FOCMA	: feline oncornavirus-associated cell membrane antigen
AML	: acute myelogenous leukemia	ITP	: idiopathic thrombocytopenic purpura
anti-BAST	: anti-basal aspect of syncytiotrophoblast	MuLV	: murine leukemia virus
anti-SSAV	: anti-simian sarcoma associated virus	RA	: rheumatoid arthritis
ATL	: adult T cell leukemia	RAEB	: refractory anemia with excess of blasts
ATLV	: adult T cell leukemia virus (HTLV I : human T cell leukemia virus I)	SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
BaEV	: baboon endogenous virus	SLE	: systemic lupus erythematosus
BAST	: basal aspect of syncytiotrophoblast	SSAV	: simian sarcoma associated virus
CLL	: chronic lymphocytic leukemia	SSV	: simian sarcoma virus
CML	: chronic myelogenous leukemia		

5. Titers of anti-BAST were decreased in the active or terminal phase and increased in the remission state of hematological malignancies. The inverse relationship was observed between the titers of anti-BAST and the number of leukemic cells in the bone marrow of patients with acute myelogenous leukemia.

(Received June 18, 1985 and accepted August 5, 1985)

**Key words:** Type C RNA retrovirus, Placenta, Leukemia, Malignant lymphoma, Autoimmune disease

## 1 緒 言

胎盤は胎児外の胎児組織であり、アルファフェトブロテイン (AFP) や胎盤性アルカリフォスファターゼのような胎児性あるいは胎盤性抗原が存在する。それらが生体の免疫系により認識される可能性については興味あるところである<sup>1)</sup>が、あまり知られていない。一方、癌細胞にはAFPのような、胎児性抗原が発現することが知られる<sup>2)</sup>が、もし胎児や胎盤に特異的な抗原に対する抗体が存在するとすれば、これは発生学的に幼若な細胞に対する生体の免疫監視機構を形成する可能性として注目される。また、最近細胞増殖や発癌と関連してRNA腫瘍ウイルスの役割が注目されている<sup>3)</sup>が、正常ヒト胎盤には常にtype C RNA retrovirus粒子が認められることが知られており<sup>4-6)</sup>、このretrovirusの関連抗原は霊長類のretrovirus関連抗原に対する抗体を用いた免疫組織学的検索によりほぼ全例の正常胎盤に検出される<sup>7)</sup>。このことからこのretrovirus関連抗原はヒトの遺伝子にcodeされた抗原と考えられ(内在性レトロウイルス)、また胎盤にのみ出現することから一種の胎児性ないし胎盤性抗原といえる可能性がある。Type C RNA retrovirusは、ヒトでは、その他に成人T細胞白血病(ATL, adult T cell leukemia)の白血病細胞に認められ、ATL virus構成蛋白に対するATLA (adult T cell leukemia associated antigen) 抗体が患者血清中に間接免疫蛍光法で検出される<sup>8)</sup>。

本研究では正常ヒト胎盤を抗原とし、主に自己免疫疾患および血液疾患をはじめ諸種疾患患者血清中にこれと反応する抗体が存在することを、免疫蛍光法その他の方法により明らかにし、その生物学的および臨床的意義について検討した。さらにこの抗体活性がヒトのretrovirus関連抗原を認識する抗体か否かについても検討を加えた。

## 2 研究方法

### 2.1 血清の採取対象

自己免疫疾患としてSLE 50例、混合性結合組織病(mixed connective tissue disease: MCTD) 14例、特発性血小板減少性紫斑病(ITP) 8例、慢性関節リウマチ(RA) 13例、自己免疫性溶血性貧血(AIHA) 3例、造血器悪性腫瘍として急性骨髄性白血病(AML) 16例、慢性骨髄性白血病(CML) 8例、refractory anemia with excess of blasts (RAEB) 2例、ATL以外の急性リンパ性白血病(ALL) 5例、慢性リンパ性白血病(CLL) 4例、ATL 8例、悪性リンパ腫12例である。その他48例の正常対照、22例の妊娠末期または分娩後1週間以内の母体血清を得、抗体活性検討時まで $-70^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。各症例についてはとくに輸血の有無、副腎皮質ホルモン・抗癌剤の使用について留意した。

### 2.2 胎盤の採取対象

9例の正常自然分娩のヒト胎盤(血液型A型5例、B型1例、AB型1例、O型2例)を分娩直後に得、小ブロックにした後ただちにドライアイス・アセトンにて冷却したn-ヘキサン中で急速凍結し、 $-70^{\circ}\text{C}$ にて保存した。また分娩直前のNZBおよびC3H系のマウス、Wister系ラットより胎盤を得、同様に凍結保存した。吸収試験その他に使用したヒト各種臓器は主に剖検時に病変のない部を採取、同様に凍結保存した。

### 2.3 抗 体

本研究においては以下の抗血清を使用した。まず間接免疫蛍光法における二次抗体としては、fluorescein isothiocyanate (FITC) またはtetraethylrhodamine isothiocyanate (RITC) 標識家兎抗ヒト免疫グロブリン $\gamma$ 鎖 $\cdot\alpha$ 鎖 $\cdot\mu$ 鎖 $\cdot\kappa$ 鎖 $\cdot\lambda$ 鎖、ヤギ抗家兎IgG、家兎抗ヤギIgG(いずれもDakopatts社製)を用いた。胎盤と反応する血清抗体の特異性の検討のための免疫蛍光阻止試験には、家兎抗ヒト補体C3c、抗ヒトfibrinogen (いずれもBehringwerke社製)、家兎抗ヒトfibronectin、抗ヒト $\beta_2$ -microglobulin、抗ヒトchorio-

nic gonadotropin (hCG), 抗 choriomammotropin (HCS), 抗 pregnancy-specific  $\beta_1$ -glycoprotein (SP-1), 抗 pregnancy zone protein (PZ, SP-3), 抗 pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A), 抗 placental lactogen, 抗 AFP(いずれも Dakopatts 社製), さらに自家製の抗 CEA, 抗 secretory component (SC), 抗 ferritin を用いた. またレトロウイルス抗原の分析のためには, 霊長類のレトロウイルスである SSAV の gag 蛋白 p 30 に対する抗体としてヤギ抗 SSAV p 28(NIH 製)および whole virus に対する抗体として抗 disrupted SSAV (anti-SSAV) (Electro-Nucleonics, Inc) を用いた. 抗レトロウイルス抗体の特異性の検討は, 種々の免疫蛍光吸収試験<sup>7)</sup>や, SSAV を抗原とし抗レトロウイルス抗体を一次抗体としたウエスタンブロット法で行った.

#### 2.4 免疫蛍光法

患者血清中の胎盤に対する抗体(以下抗胎盤抗体と仮称する)の検出には間接免疫蛍光法を用いた. すなわち被検血清を PBS にて 4 倍に稀釈し, これを一次抗体として胎盤凍結切片(厚さ 4  $\mu$ m)と湿潤箱(moist chamber)内にて 37°C, 60 分間反応させ, 次に PBS 中で充分洗浄後, 蛍光色素標識抗ヒト  $\gamma$  鎖,  $\alpha$  鎖または  $\mu$  鎖と 37°C, 30 分間反応させ血清中の抗胎盤抗体活性の有無をみるとともにその抗体活性がどの免疫グロブリンクラスに属するかをみた. また陽性血清は倍倍稀釈し免疫蛍光法上の最高稀釈倍数(titer)を決定した. 免疫蛍光反応の観察には Zeiss スタンダード型顕微鏡を用い, FITC および RITC の観察を規定条件下に行った.

既知の抗原の免疫組織学的分布は間接免疫蛍光法によったが, その際, 使用する蛍光色素標識抗体は充分量のアセトン抽出ラット肝粉末にて吸収し非特異染色を除去するとともに, 常に蛍光色素標識二次抗体のみの陰性対照をおき非特異反応を除外した.

#### 2.5 免疫蛍光吸収試験と吸収用抗原の作製

抗胎盤抗体の対応抗原を明らかにする目的で抗体陽性血清を種々の抗原により吸収した. すなわち抗体の最高稀釈倍数を決定後, その 2 管下の稀釈度の血清を, Table 1 に記した抗原と等量に混合し, よく振とうした後, 37°C, 60 分間, 続いて 4°C, 12 時間インキュベート, 9,000 $\times$ g, 30 分間遠心し上清中の残存抗体活性の有無を検討した.

吸収抗原としては, まず抗体が heterophil antibody である可能性を否定するために Table 1, Group I にあ

る赤血球数を調整した. 抗体の組織特異性を検討するために Table 1, Group II にあける各種臓器ホモジネートを用いた. 各ホモジネートは同量の PBS を加えた後ガラスホモジナイザーを用いて作製した. 対応抗原が既知の胎児・胎盤性抗原である可能性について検討する目的では, Table 1, Group III にあける大腸癌の肝転移巣より分離した CEA, AFP としては原発性肝癌患者血清 (AFP, 15,000 ng/ml) ならびに絨毛癌由来培養細胞や胎盤性抗原を用いた. さらに Table 1, Group IV にあけるレトロウイルスおよびレトロウイル

Table 1 Immunofluorescent absorption (IFA) test of anti-BAST positive sera.

Antigens used for IFA test		Absorption effect
Group I		
human RBC (A)	10 <sup>6</sup> /ml	—
(B)	10 <sup>6</sup> /ml	—
(O)	10 <sup>6</sup> /ml	—
sheep RBC	10 <sup>6</sup> /ml	—
actin <sup>1)</sup>	10 mg/ml	—
myosin <sup>1)</sup>	10 mg/ml	—
normal rabbit serum protein	10 mg/ml	—
fetal calf serum protein	10 mg/ml	—
Group II: human tissue homogenate		
brain		—
lung		—
liver		—
spleen		—
small intestine		—
pancreas		—
placenta C 84-7		++
C 84-8		±
C 84-13		+
Group III		
CEA		—
AFP		—
hCG <sup>2)</sup>		—
estrogen <sup>2)</sup>		—
placental alkaline phosphatase <sup>1)</sup>		—
disrupted BeWo cell		—
Group IV		
disrupted SSV/SSAV		+
disrupted BaEV		—
disrupted MT-1 cell infected with ATLTV		—
type C virus fraction purified from human placenta homogenate (density at 1.15-1.17 g/ml in sucrose)		+

<sup>1)</sup> Sigma <sup>2)</sup> Mochida

ス感染培養細胞を用い、対応抗原について検索を加えた。

胎盤レトロウイルス分画は、胎盤組織に等重量の buffer (0.01 M Tris・HCl, pH 7.8/0.1 M NaCl/0.001 M EDTA) を加えたあと、Virtis ホモジェナイザーにてホモジェナイズし、 $2,000\times g$  にて 30 分間遠心し上清をとりレトロウイルス粗分画とし、さらにこれをショ糖密度勾配法を用いた遠心でショ糖濃度 1.15–1.17 g/ml のレトロウイルス分画を採取した。ショ糖密度勾配法を用いた遠心は Nelson *et al.*<sup>9)</sup> の方法によった。培養細胞は凍結融解を繰り返すことにより、ウイルスは Tween 80-エーテルを用い破壊した。

## 2.6 免疫蛍光阻止試験

吸収試験と同様に抗胎盤抗体に対応する抗原をあきらかにする目的で胎盤凍結切片をあらかじめ既知の抗原に対する抗体と 37°C、30 分間反応させ、次いで抗胎盤抗体陽性血清と反応せしめ阻止反応が起こるか否かを間接免疫蛍光法で検討した。

## 2.7 免疫蛍光法における対応抗原に対する固定液の影響

胎盤凍結切片の無固定標本を冷アセトン、冷 95% エタノールまたは 10% 中性ホルマリンにて、それぞれ 5 分、10 分、20 分、30 分間固定し、抗胎盤抗体に対する抗原性が保たれるか否かをみるとともに、無固定の場合と差があるか否かについても検討した。

## 2.8 抗体の酵素処理

胎盤に対する反応が抗原・抗体反応によるものであることを確認する目的で陽性血清のセファデックス G200 ゲル濾過を行い IgM 分画を採取、これをペプシンおよびトリプシンで消化後再度ゲル濾過を行い F(ab')<sub>2</sub> および (Fc)<sub>2</sub> を得<sup>10,11)</sup>、これを一次抗体、蛍光色素標識抗ヒト  $\kappa$  鎖・ $\lambda$  鎖を二次抗体として抗体活性が酵素処理後も保たれるか否かをみた。

## 2.9 ウェスタンブロット法による対応抗原の分析

胎盤に対する血清抗体の対応抗原の分子生物学的性状をみる目的で胎盤より分離したレトロウイルス粗分画および disrupted SSAV を非還元および 2 メルカプトエタノールを用いた還元状態で SDS-PAGE を行い、これをニトロセルロース膜に移しとり<sup>12)</sup>、抗胎盤抗体陽性血清またはモルモット抗 SSAV を一次抗体、ペルオキシンダーゼ標識抗ヒト  $\mu$  鎖抗体または抗モルモット IgG を二次抗体として、3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride にて発色させ対応抗原の分子量を決定するとともに、これらが血清抗体および抗 SSAV 両者により認識されるか否かをみた。また対応抗原の性状を分

析するためには、レンチルーレクチン セファロース 4B を用いたカラムクロマトグラフィーを行い<sup>13)</sup>、レンチルーレクチン結合性の分画と非結合性の分画にわけ、それぞれ抗胎盤抗体陽性血清および抗 SSAV との反応性をウェスタンブロット法で解析した。

## 2.10 推計学的検定

抗胎盤抗体の免疫蛍光法上での抗体価は 2 の累乗として表し、抗体価の平均値を算出する場合には、抗体価が 2<sup>2</sup> で陰性の場合には 2<sup>0</sup> として扱った。推計学的検討は t 検定または Welch 検定、および Yates 補正による  $\chi^2$  検定によった。

## 3 成績

### 3.1 免疫蛍光法による患者血清中の抗体の検出

SLE, ITP をはじめとするいわゆる自己免疫疾患や、白血病をはじめとする造血臓器の悪性腫瘍患者血清中には、しばしば間接免疫蛍光法上、細胞核・細胞質・胎盤絨毛間隙の赤血球と反応する抗体活性を認めた。しかし、その他に胎盤のシンチチオトロホプラスト (syncytiotrophoblast) と反応する抗体活性がしばしば検出された。この抗胎盤抗体は免疫蛍光法上とくに Fig. 1a に示すようにシンチチオトロホプラストの基底膜面に一致した強い反応として認められ注目された。そこでこの細胞の基底膜面 (basal aspect of syncytiotrophoblast: BAST) に対する抗体を anti-BAST と呼ぶことにする。BAST は電顕上 type C virus 粒子の観察される部位であり、また抗 SSAV p28 により免疫組織学的に検出される SSAV p28 関連抗原が存在する部位であるため (Fig. 1b)、本研究ではこの点をも含めて anti-BAST の特異性について検討を加えた。

### 3.2 Anti-BAST の特異性の解析

#### 3.2.1 血清 anti-BAST の免疫グロブリンクラス

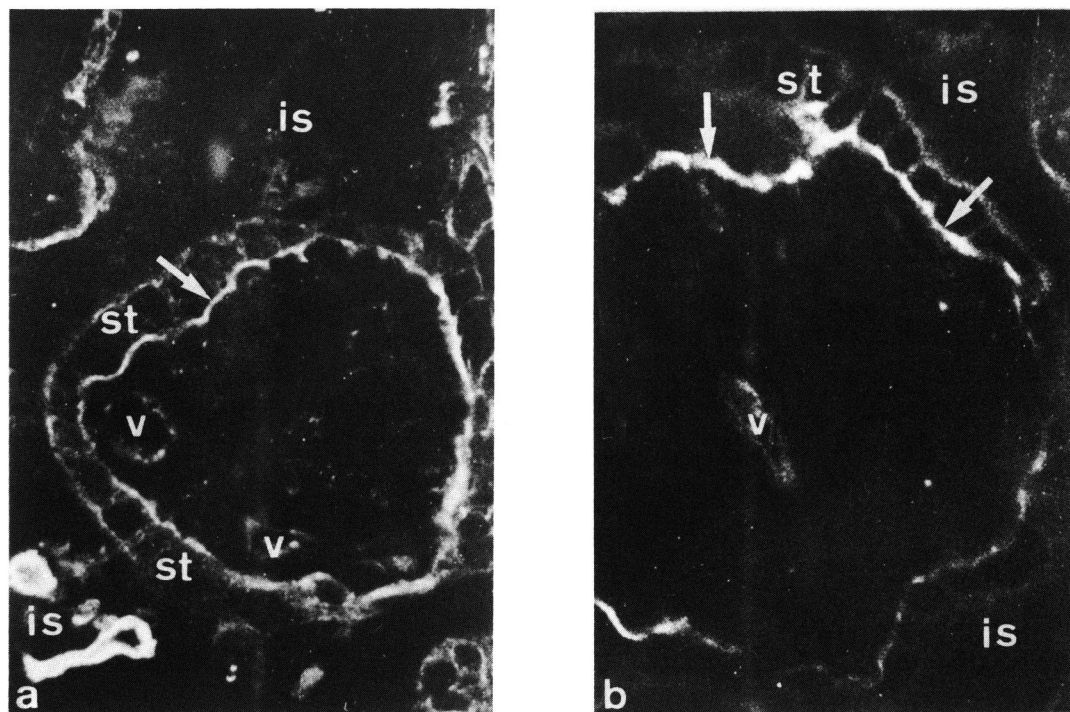
患者血清を胎盤凍結切片と反応後、二次抗体として蛍光色素標識抗ヒト  $\alpha$  鎖・ $\gamma$  鎖・ $\mu$  鎖を用いこの anti-BAST 活性の免疫グロブリンクラスを検討すると、全例が IgM クラスであり、IgG および IgA クラスの anti-BAST は認められなかった。

#### 3.2.2 免疫蛍光法における固定法の影響

Anti-BAST の免疫蛍光法における反応性に及ぼす固定法の影響をみると、冷アセトン、冷 95% エタノール固定によっては影響をうけなかったが、ホルマリン固定により反応性を失った。本研究においては免疫蛍光反応は無固定標本を用いて行った。

#### 3.2.3 マウスおよびラットの胎盤との交叉反応性

Anti-BAST 陽性血清が NZB および C3H マウスや



**Fig. 1a** The detection of IgM antibody activity reacting with the basal aspect of syncytiotrophoblast of human chorionic villi (anti-BAST) by indirect immunofluorescence. The serum of an ITP patient was used as the first antibody, and RITC conjugated anti-human mu-chain (rabbit) was used as the second antibody. The target was an unfixed cryostat section ( $4\mu\text{m}$  in thickness) of a normal term placenta. st: syncytiotrophoblast, v: fetal vessel, is: intervillous space, arrow: basal aspect of syncytiotrophoblast.

**Fig. 1b** Indirect immunofluorescent detection of gag-coded SSAV p30 (p28)-related antigen in normal term human placenta using anti-SSAV p28 (goat) as the first antibody, and FITC conjugated anti-goat gamma-chain as the second antibody. The same fluorescent pattern as seen in Fig. 1a was observed.

Wister 系ラットの胎盤と反応するか否かをヒト胎盤の場合と同様に免疫蛍光法で検討したが、それらとの反応は認められなかった。

### 3・2・4 吸収試験による検討

Anti-BAST の対応抗原を検索する目的で Table 1 に記した種々の抗原による吸収試験を行った。まず臓器特異性をみるために、anti-BAST 陽性血清を Table 1 の Group II に示す正常ヒト各種臓器ホモジェネートで吸収したが、胎盤以外の臓器では吸収されず、検索した限りでは、本抗体は胎盤特異的であると考えられた。しかし、3 種の胎盤ホモジェネートでは吸収の程度に差が認められた。次に anti-BAST がいわゆる heterophil antibody である可能性を検討するために、Table 1 の Group I の羊赤血球その他で吸収試験をおこなったが、そのいずれによっても吸収されず、血液型質を

はじめとする抗原はその対応抗原とは考えられなかった。

BeWo cell は胎盤絨毛細胞癌由来の培養細胞であり、各種の胎盤性ホルモンを産生していることが知られているが、anti-BAST は、この細胞や、Table 1 の Group III にあげる CEA, AFP, hCG および胎盤性アルカリフォスファターゼによっても吸収されず、anti-BAST の対応抗原は、正常胎盤には存在するが培養絨毛細胞には存在せず、また、hCG その他の既知の抗原でもないことが示唆された。

そこで type C virus に注目し、Table 1 の Group IV にあげる各種 type C virus および virus 感染細胞により吸収試験を試みると、anti-BAST は、胎盤よりショ糖密度勾配法により分離精製された type C virus 分画と SSAV によってのみ吸収され、これらとの交叉

反応性が示唆されたが、ATLV, BaEV との交叉反応性は認められなかった。

### 3・2・5 免疫蛍光阻止試験による検討

Anti-BAST の対応抗原を免疫蛍光阻止試験によっても検索した。胎盤には、胎盤特異的なホルモンやいわゆる妊娠関連蛋白が存在するため、2・3 に述べたこれらの既知の抗原に対する特異抗体を用いた。また、最近胎盤における抗原抗体反応の結果として C3 をはじめとする補体の沈着が報告されているため<sup>14)</sup>、これらの成分に対する抗体も用いた。その結果胎盤・妊娠関連ホルモンおよび抗原や C3、フィブリノーゲンなどに対する抗体により胎盤切片を処理しても anti-BAST の反応性は阻止されず、これらの既知の抗原と anti-BAST 対応抗原との関連性は否定された。

### 3・2・6 Anti-BAST の消化試験による検討

Anti-BAST 陽性および陰性血清を選び、これより作製した  $F(ab')_2\mu$  および  $(Fc)_3\mu$  を間接免疫蛍光反応の一次抗体として、RITC 標識抗ヒト  $\kappa$  鎖・ $\lambda$  鎖を二次抗体として、これらの IgM フラグメントが、胎盤凍結切片と反応するかをみた。その結果 anti-BAST 陽性血清より得た  $F(ab')_2\mu$  は BAST に対する反応性を保持した (Fig. 2a) が、anti-BAST 陰性血清より得た  $F(ab')_2\mu$  は反応性を認めなかった。また  $(Fc)_3\mu$  はその由来が anti-BAST 陽性、陰性にかかわらず BAST とは反応しなかった (Fig. 2b)。また、二次抗体として RITC 標識抗ヒト  $\mu$  鎖を用いた場合はいずれのフラグメントも BAST とは反応性を示さなかった。

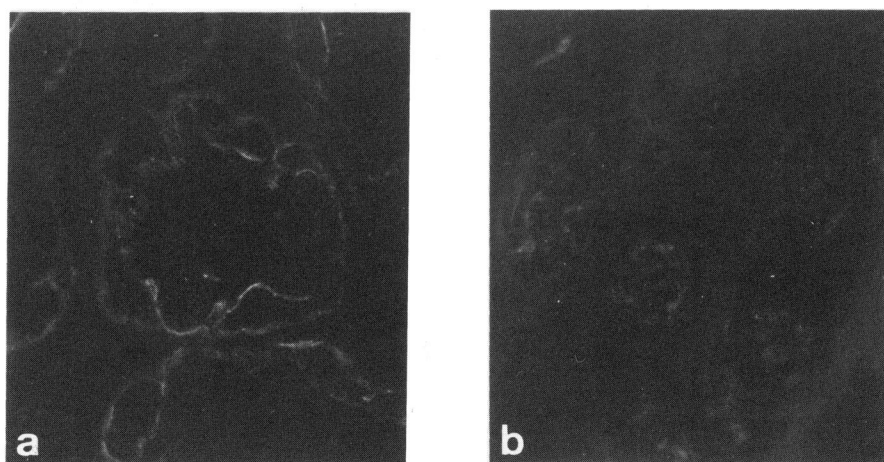


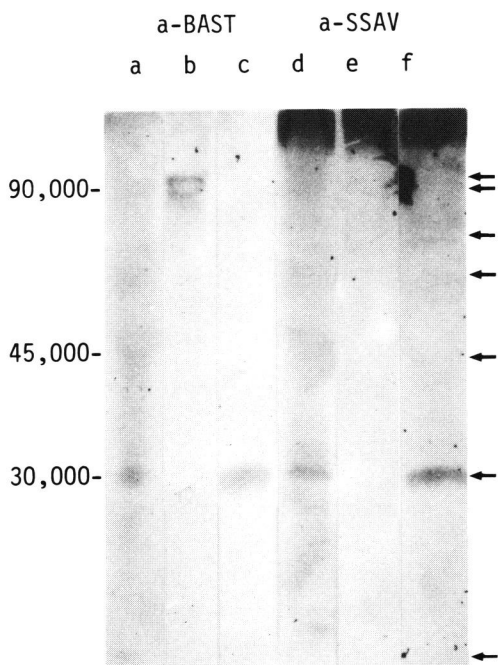
Fig. 2 Indirect immunofluorescent reaction using  $F(ab')_2\mu$  (Fig. 2a) and  $(Fc)_3\mu$  (Fig. 2b) of IgM purified from anti-BAST positive serum.  $F(ab')_2\mu$  fraction retained its reactivity to BAST, while  $(Fc)_3\mu$  lost its reactivity.

### 3・2・7 Anti-BAST 対応抗原のウェスタンブロット法による検索

Fig. 3 の lane a にしめすように、今回の条件下では anti-BAST 陽性血清は胎盤より分離したレトロウイルス粗分画の分子量 90,000, 75,000, 60,000, 45,000, 30,000, 20,000 ダルトン領域の抗原 (矢印) とウェスタンブロットにより反応した。反応抗原の分子量は還元および非還元状態で差異を示さなかった。

各々の抗原について詳細に検討すると、anti-BAST 陽性血清と反応する 90,000 ダルトン領域の抗原は、分子量の異なった 2 つの抗原からなり、この抗原は lane b にしめすごとくレンチルーレクチン セファロース 4B に結合することから糖蛋白と考えられ、また 30,000 ダルトン領域の抗原はレンチルーレクチンに非結合性であることから蛋白である可能性が考慮された。

同様にレトロウイルス粗分画と anti-SSAV との反応性をみた。anti-SSAV は disrupted SSAV の主に p30 と反応することを確かめてある (Fig. 4, 矢印) が、anti-SSAV は anti-BAST 陽性血清が反応した抗原のうち、75,000, 60,000, 45,000, 30,000 ダルトン領域の抗原とは反応したが、レンチルーレクチン結合性の 90,000 ダルトン領域の 2 つの抗原とは反応しなかった。また、とくに 30,000 ダルトン領域のレンチルーレクチン非結合性抗原は anti-BAST 陽性血清および霊長類レトロウイルス SSAV に対する抗体の両者に強く反応した。

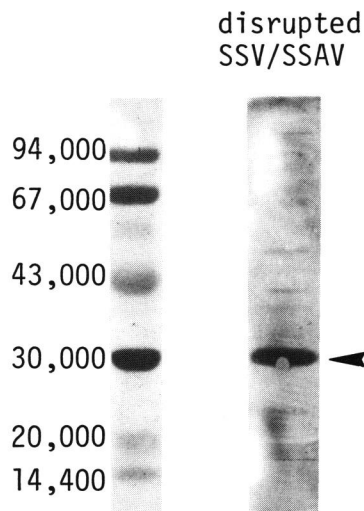


**Fig. 3** Western-blotting analysis of anti-BAST positive serum and anti-SSAV serum against normal term human placenta antigens. lane a and d: crude retrovirus fraction of placenta, lane b and e: Lentil-lectin bound fraction of placenta homogenate, lane c and f: Lentil-lectin unbound fraction of the placenta homogenate. Lane a, b and c reacted with anti-BAST positive serum (1:1,000 diluted by PBS/0.05% Tween 20/pH 7.6) as the first antibody for 3 hours at room temperature, and thereafter, with peroxidase conjugated anti-human  $\mu$ -chain (1:400 diluted, absorbed by serum-free human placenta homogenate for 12 hours at 4°C). Lane d, e and f reacted with guinea pig anti-SSAV (1:1,000 diluted) as the first antibody for 3 hours at room temperature, and then with peroxidase conjugated anti-guinea pig IgG (1:400 diluted, absorbed by serum-free human placenta homogenate for 12 hours at 4°C).

### 3.3 各種疾患患者血清における anti-BAST の検出頻度とその抗体価

Anti-BAST は自己免疫疾患では SLE 50 例中 14 例, MCTD 14 例中 4 例に検出され (Table 2, 3), 検出頻度からみると SLE, ITP, RA および AIHA において, 正常対照と比較して有意に高かった (Table 2). また anti-BAST は各種造血器腫瘍でもしばしば検出され, AML, ALL および悪性リンパ腫で有意に高く検出された (Table 2).

Anti-BAST 抗体価をみると, SLE と急性白血病に



**Fig. 4** Reactivity of anti-SSAV with disrupted SSV/SSAV (right lane). SSV/SSAV (Electro-Nucleonic, Inc) was disrupted by Tween-ether. Anti-SSAV (1:1,000 diluted) was used as the first antibody, peroxidase conjugated anti-guinea pig IgG as the second antibody. left lane: molecular weight marker stained by Coomassie brilliant blue R.

**Table 2** Frequency of the detection of anti-BAST.

disease	frequency of detection	$\chi^2$ analysis
hematological malignancy		
AML	13/16 (81.3%)	$p < 0.01$
RAEB	1/ 2 (50.0%)	n. s.
CML	3/ 8 (37.5%)	n. s.
ALL	4/ 5 (80.0%)	$p < 0.01$
CLL	1/ 4 (25.0%)	n. s.
ATL	3/ 8 (37.5%)	n. s.
malignant lymphoma	6/12 (50.0%)	$p < 0.01$
autoimmune disease		
SLE	14/50 (28.0%)	$p < 0.05$
MCTD	4/14 (28.6%)	n. s.
ITP	5/ 8 (62.5%)	$p < 0.01$
RA	8/13 (61.5%)	$p < 0.01$
AIHA	2/ 3 (66.7%)	$p < 0.05$
pregnancy	4/22 (18.2%)	n. s.
normal control	4/48 (8.3%)	

n. s., not significant

おいて高く, 稀釈倍数で 256 倍以上を呈する例を認めた. 正常対照や妊婦血清では少数の anti-BAST 陽性例を認めたが, その抗体は 16 倍以下と低値であった (Table 3). 各疾患における anti-BAST 陽性および陰性例全体の平均値と anti-BAST 陽性例のみの平均値

Table 3 Titer of anti-BAST in various diseases.

disease	titer (1:)									
	2 <sup>0</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>10</sup>
hematological malignancy										
AML	3	3	2	4	1	1	1	0	0	1
RAEB	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
CML	5	0	3	0	0	0	0	0	0	0
ALL	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
CLL	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ATL	5	0	0	1	1	1	0	0	0	0
malig. lymph	6	2	1	2	0	0	0	1	0	0
autoimmune disease										
SLE	36	5	6	1	1	0	0	1	0	0
MCTD	10	2	0	1	1	0	0	0	0	0
ITP	3	1	1	1	2	0	0	0	0	0
RA	5	3	4	0	1	0	0	0	0	0
AIHA	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
normal control	44	2	1	1	0	0	0	0	0	0
pregnancy	18	1	2	1	0	0	0	0	0	0

Table 4 The mean titers of anti-BAST (1:2<sup>x</sup>) in hematological malignancies and autoimmune diseases.

disease	Titers (1:2 <sup>x</sup> ) of anti-BAST	
	for cases positive and negative	for positive cases only
AML	3.50±2.68	p<0.01 4.30±2.28
RAEB	3.00±4.24	
CML	1.12±1.55	
ALL	4.00±3.39	5.00±2.94
CLL	1.00±1.00	
ATL	1.87±2.64	5.00±1.00
Malig. Lymph.	1.91±2.50	p<0.05 3.83±2.22
SLE	0.90±1.68	p<0.05 3.21±1.62
MCTD	0.92±1.68	3.25±1.50
ITP	2.37±2.19	p<0.05 3.80±1.30
RA	1.76±1.64	p<0.01 2.87±0.99
AIHA	2.33±2.51	3.50±2.12
Pregnancy	0.54±1.22	3.00±0.81
Control	0.22±0.80	2.75±0.95

を Table 4 に示し、各々について正常対照と比較したが、全体としてみた場合には、AML、悪性リンパ腫、SLE、ITP および RA で anti-BAST 抗体価は有意に上昇を示し、anti-BAST 陽性例についてのみ比較した場合には、推計学的有意差は認められなかった。

次に急性白血病症例について FAB 分類を行い、これと anti-BAST 検出頻度に関連性があるか否かを検討したが Table 5 に示すごとく今回検索した限りでは関連性は認められなかった。

Table 5 Frequency of the detection of anti-BAST and FAB classification of acute leukemia.

FAB Classification		Frequency of the Detection
AML	M 1	5/7 ( 71.4%)
	M 2	3/4 ( 75.0%)
	M 3	1/1 (100.0%)
	M 4	3/3 (100.0%)
	M 5	0/0
	M 6	1/1 (100.0%)
ALL	L 1	1/1 (100.0%)
	L 2	3/4 ( 75.0%)
	L 3	0/0

### 3・4 Anti-BAST 抗体価と病態との関連性

Anti-BAST と病態変動との関連性をみるために少数例ではあるが経過を追って anti-BAST 抗体価をみると、検索した限りでは白血病など血液疾患では Fig. 5 に示すごとく、病態末期において anti-BAST 抗体価は低下する傾向を認めた。急性白血病においては、輸血をおこなっていない発症初期の血清でも anti-BAST はしばしば検出された。また AML 症例において骨髓中白血病細胞数と anti-BAST 抗体価との間には逆の変動を示す傾向がうかがわれた (Fig. 6)。次に SLE 症例については anti-BAST 抗体価と抗 DNA 抗体、白血球数、CRP など病勢のマーカーとなる検査所見と対比したが (Fig. 7)、今回検索した限りでは明瞭な関連性はみい出し得なかった。

## 4 考 察

本研究において、AML など造血器悪性腫瘍や SLE など自己免疫疾患患者血清中に、免疫蛍光法により正常ヒト・ジンチチオトロホプラスト基底膜面と反応する抗体を検出し anti-BAST と名付けた。anti-BAST は IgM 型抗体で、種々の抗原を用いた免疫蛍光吸収試験や、既知の抗体を使用した免疫蛍光阻止試験の結果から、胎盤と特異的に反応し、また胎盤より分離精製したレトロウイルス分画および霊長類レトロウイルスである SSAV と交叉反応性を示すことが明らかとなった。ウェスタンブロット法により anti-BAST の対応抗原を検索すると、anti-BAST は anti-SSAV の認識するレンチルーレクチン非結合性の 30,000 ダルトン領域の分子量の抗原と反応することが明らかとなった。anti-BAST の抗体価と臨床経過との関連性を検討すると、SLE ではとくに明瞭な関連性は得られなかったが、AML など造血器悪性腫瘍では病態の末期で抗体価の低下が認められた。



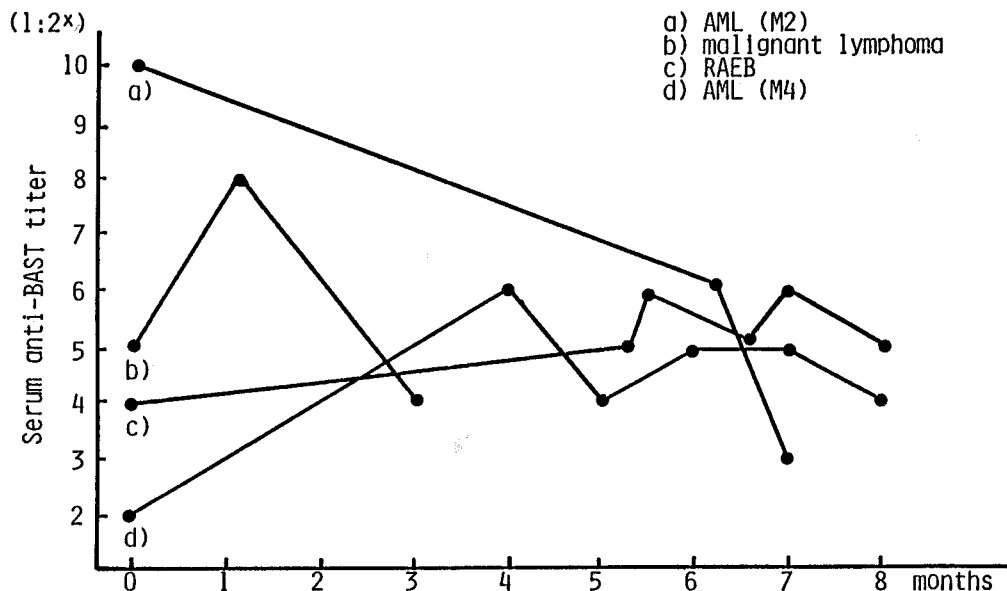


Fig. 5 Changes of the titers of serum anti-BAST in the clinical course of patients with hematological malignancies.

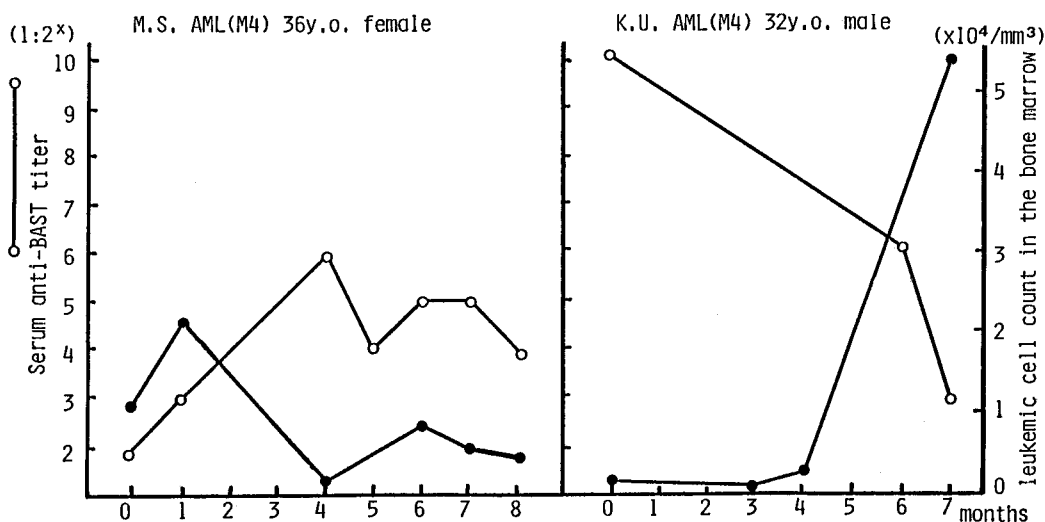


Fig. 6 The relationship between the titers of anti-BAST and leukemic cell counts in bone marrow of the patients with AML.

以上成績の順に基づいて考察を加える。

#### 4.1 Anti-BAST の対応抗原について

ヒト血清中に出現する体成分に対する抗体活性の特異性については、吸収試験をはじめとする種々の詳細な検討が必要である。本研究では Table 1 に示すごとく多くの臓器ホモジネートによる吸収試験の結果から、anti-BAST が胎盤と特異的に反応することを明らかにした。しかし胎盤が産生し胎盤に特異的に存在す

るとされている種々の抗原、すなわち hCG、胎盤性アルカリフォスファターゼ、SP-1 などや絨毛癌由来培養細胞 BeWo cell とも反応しないことが示された。

次に anti-BAST の対応抗原として、胎盤に存在することが知られるレトロウイルス関連抗原<sup>7)</sup>について検討した。レトロウイルスに共通の遺伝子産物にはマウス・レトロウイルスを例にとると、gag 遺伝子産物として p30, p15, pol 遺伝子産物として逆転写酵素 (reverse

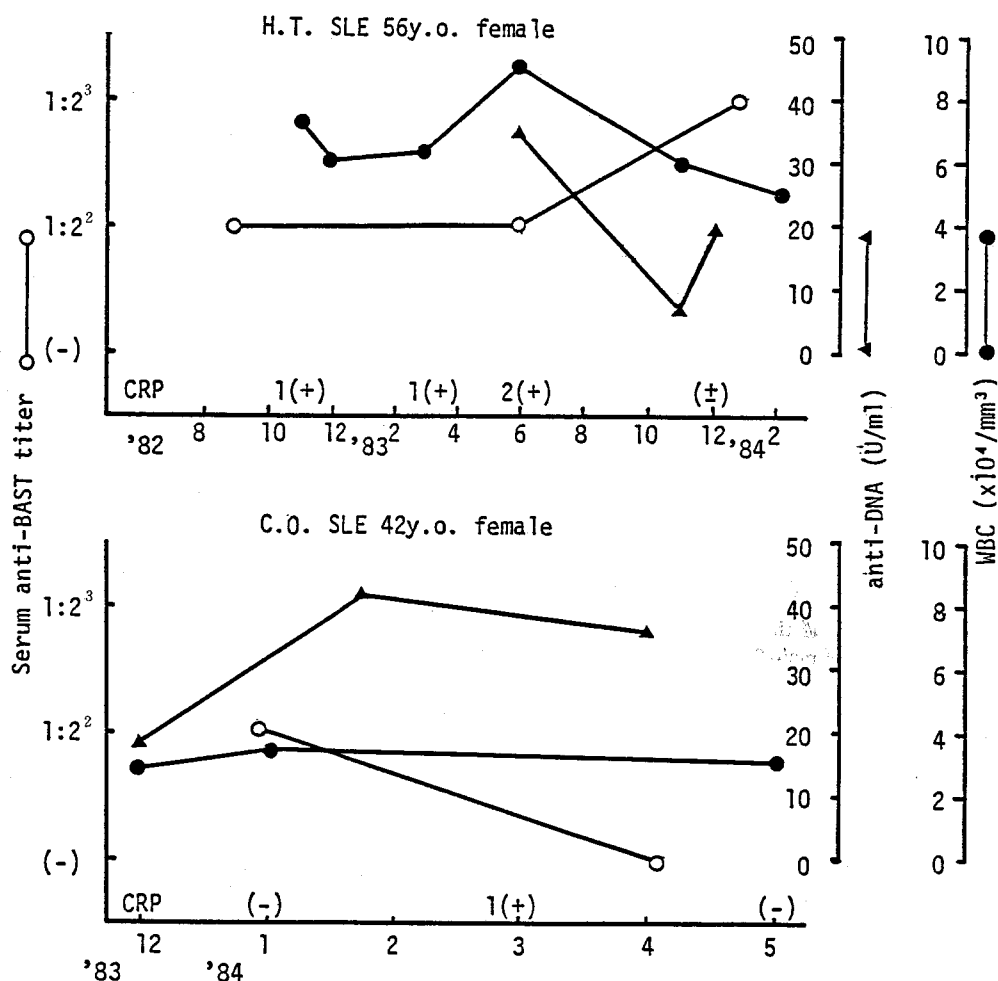


Fig. 7 The relation of titers of anti-BAST to CRP, white blood cells and anti-DNA antibody of the patients with SLE.

transcriptase), env 遺伝子産物として gp70, p15E が知られ, これらの分子上には, type-specific, group-specific<sup>15,16)</sup>, interspecies-specific<sup>17,18)</sup> の抗原決定基が存在する. すなわちレトロウイルス構成成分に対する抗体は, その免疫源とは異なったレトロウイルス関連抗原の group-または interspecies-specific な抗原決定基と交叉反応することが知られている. 著者らは anti-SSAV p28 を用いた免疫組織学的検索から胎盤には SSAV p28 関連抗原の存在することを報告したが<sup>7)</sup>, anti-BAST 対応抗原の免疫組織学的分布は, Fig. 1 に示すようにこの SSAV p28 関連抗原の分布と光学顕微鏡レベルでは完全に一致し, またウエスタンブロット法による解析でも anti-BAST は anti-SSAV の認識する 30,000 ダルトン領域の抗原と反応することから本抗体は霊長類レトロウイルスのすくなくとも gag 遺伝

子産物関連抗原と反応する抗体であることが考えられた. さらにヒトを含めた他の霊長類レトロウイルスとの関連性を検討するために, SSAV, BaEV さらには ATL 感染 MT-1 細胞<sup>9)</sup> による吸収試験を行ったが, anti-BAST は BaEV, ATL では吸収されず, 本抗体は霊長類レトロウイルスの中でも SSAV とのみ交叉反応することが明らかとなった. 本抗体は IgM 型であり, IgG 型 ATL 抗体陽性の ATL 血清 8 例中 3 例にしか anti-BAST は検出されなかったことも, anti-BAST 対応抗原は ATL ではないことを示す所見と考えられる.

#### 4.2 悪性腫瘍の免疫監視機構と anti-BAST

ヒトの免疫系の役割の一つとして悪性腫瘍の発生に対する監視機構があげられている. ウイルスの遺伝子に code されている抗原は以前より生体の免疫系が腫瘍

細胞を認識する上でのマーカーとなりうると考えられており<sup>19)</sup>, レトロウイルス感染腫瘍細胞表面に env 糖蛋白が存在することはよく知られているが, Yoshiki *et al.*<sup>20,21)</sup> はマウス白血病ウイルスである MuLV やネコ白血病ウイルスである FeLV 感染腫瘍細胞表面に gag 蛋白が発現することを報告し注目されている。また FeLV 感染に際しネコ血清中に出現する FOCMA (feline oncornavirus-associated cell membrane antigen) に対する抗体は<sup>22,23)</sup>, ネコ白血病の発生を抑制し免疫監視機構の役割を演ずることが知られているが, anti-BAST についても FOCMA 抗体と同様の意義を有するか否かについて今後検討する必要がある。

#### 4.3 Anti-BAST 抗体価の臨床的意義について

Anti-BAST の臨床的意義を検討すべく一部の症例につき臨床経過に伴って抗体価がどのように変化するかを検討すると, Fig. 5 に示すように造血器悪性腫瘍患者の末期において抗体価の低下がしばしば認められ, また Fig. 6 に示すように AML の 2 症例において抗体価と骨髓内腫瘍細胞数とは逆の変動をとることが認められた。このことは anti-BAST が腫瘍細胞の増生と密接に関連することを示唆する所見と推測される。

また自己免疫疾患において, 経時的に anti-BAST 抗体価を測定したが, SLE 症例においては, anti-BAST は病勢のマーカーである CRP や抗 DNA 抗体価との間で明瞭な関連性は見出し得なかったが, SLE など自己免疫疾患における anti-BAST の出現は自己免疫疾患における多クローン性 B cell 活性化と関連しておこり, ウイルス関連抗原あるいはウイルスにより修飾された胎児性抗原に対応する B cell クローンの増生の結果と考えることも可能かもしれない。しかし一方, SLE や ITP, AIHA では NZ マウスの知見よりレトロウイルスがこれらの疾患の発症に関与しているとの考え方もあり<sup>24)</sup>, この点からも興味を持たれる。最近 SLE 患者血清中に BaEV の逆転写酵素活性を阻止する IgG 抗体が検出されるとの報告もあり<sup>25)</sup>, その検出頻度は今回の anti-BAST の検出頻度と同程度であることは興味深く, その臨床的意義についてはさらに検討する必要がある。

本研究の結果からは, 現時点において anti-BAST 対応抗原がレトロウイルスの遺伝子に直接 code されている抗原であるか否かについてはなお不明と言わざるを得ないが, これまで報告されたヒトのレトロウイルス抗原は, SSAV との抗原性の類似が認められており<sup>26,27)</sup>, anti-BAST がヒトのレトロウイルスまたはレトロウイルス関連抗原に対する抗体である可能性は極めて高い

と言えよう。

## 5 結 論

各種造血器腫瘍および自己免疫疾患患者血清中に胎盤に存在する抗原と反応する抗体が出現することを免疫蛍光法およびウェスタンブロット法にて確かめ, さらにこの血清抗体の対応抗原がレトロウイルス関連抗原である可能性についても検索し以下の結論を得た。

1) AML をはじめとする造血器腫瘍や, SLE をはじめとする自己免疫疾患患者血清中には, ジンチチオトロホプラストの基底膜面と反応する IgM 型抗体 (anti-BAST) が出現することを初めて明らかにした。

2) この IgM 型抗体の特異性を吸収試験および阻止試験により検討したところ, 本抗体は霊長類レトロウイルスおよび胎盤よりシヨ糖密度勾配法にて分離したシヨ糖濃度 1.15–1.17 g/ml のレトロウイルス分画とのみ反応し, ヒトの内在性レトロウイルス関連抗原と交叉反応することが示された。

3) ウェスタンブロット法にて本抗体の対応抗原を検索すると, 本抗体は主にレンチル-レクチン結合性の分子量 90,000 領域の糖蛋白抗原とレンチル-レクチン非結合性の分子量 30,000 領域の抗原と反応することが明らかとなった。このうち分子量 30,000 領域の抗原は霊長類レトロウイルスに対する抗体によっても認識され, ここでも本抗体がレトロウイルスと交叉反応性を示すことが認められた。

4) 本抗体は, 正常対照と比較して, AML, ALL, 悪性リンパ腫, SLE, ITP, RA および AIHA で推計学的に有意に検出され, また AML, ALL, 悪性リンパ腫, SLE で高抗体価例を認め, これらの疾患においてはレトロウイルス関連抗原の出現の可能性が示唆され, しいては病因への関与が推測された。

5) 少数例ではあるが本抗体と病態との関連性について検討すると, 自己免疫疾患では明瞭な関連性は認め得なかったが, AML など造血器悪性腫瘍では末期に抗体価の低下する傾向をしめすと共に, 骨髓中の腫瘍細胞数とは逆の変動を示す傾向が認められ, 本抗体が病態と密接に関連することが示唆された。

## 謝 辞

御指導, 御校閲いただいた本学内科学第一講座谷内昭教授, 研究に際して貴重な御助言をいただいた米国コーネル大学医学部病理 R. C. Mellors 教授に深謝いたします。

本研究は, 文部省一般研究(C) 60570560 の補助に

よった。

## 文 献

1. Brent, L., Hunt, R., Hutchinson, I. V., Medawar, P. B., Palmer, L. and Welsh, L.: Host recognition of fetal antigens: do they induce specific antibodies? In: Bodmer, W. F.: Fetal antigens and cancer. (Ciba Foundation Symposium 96) 125-137, Pitman, London (1983).
2. Avelev, G. I., Perova, S. D., Kharamkova, N. I., Postnikova, Z. A. and Irlin, I. S.: Production of embryonal  $\alpha$ -globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation* **1**, 174-180, (1963).
3. Kaplan, H. S.: Retroviral aetiology of 'virus-free' animal leukaemias and lymphomas. In: Goldman, J. M. and Jarrett, O.: Mechanisms of viral leukemogenesis. 1-10, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York (1984).
4. Kalter, S. S., Helmke, R. J., Heberling, R. L., Panigel, M., Fowler, A. K., Strickland, J. E. and Hellman, A.: C-type particles in normal human placentas. *J. Natl. Cancer Inst.* **50**, 1081-1084 (1973).
5. Imamura, M., Phillips, P. E. and Mellors, R. C.: The occurrence and frequency of type C virus-like particles in placentas from patients with systemic lupus erythematosus and from normal subjects. *Am. J. Pathol.* **83**, 383-394 (1976).
6. Ueno, H., Imamura, M. and Kikuchi, K.: Frequency and antigenicity of type C retrovirus-like particles in human placentas. *Virchows Archiv A* **400**, 31-41 (1983).
7. Maeda, S., Mellors, R. C., Mellors, J. W., Jerebek, L. B. and Zervoudakis, I. A.: Immunohistological detection of antigen related to primate type C retrovirus p30 in normal human placentas. *Am. J. Pathol.* **112**, 347-356 (1983).
8. Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M., Matsumoto, T., Kinoshita, K., Shirakawa, S. and Miyoshi, I.: Adult T-cell leukemia: Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6476-6480 (1981).
9. Nelson, J., Leong, J. and Levy, J. A.: Normal human placentas contain RNA-directed DNA polymerase activity like that in viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 6263-6267 (1978).
10. Kishimoto, T., Onoue, K. and Yamamura, Y.: Structure of human immunoglobulin M. III. Pepsin fragmentation of IgM. *J. Immunol.* **100**, 1032-1040 (1968).
11. Plaut, A. G. and Tomasi, T. B. Jr.: Immunoglobulin M: Pentameric Fcmu fragments released by trypsin at higher temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **65**, 318-322 (1970).
12. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4353 (1979).
13. Smart, J. E. and Hogg, N.: Alteration in membrane glycoproteins after type-C virus infection of murine fibroblasts. *Nature* **261**, 314-316 (1976).
14. Sinha, D., Wells, M. and Pagefaulk, W.: Immunological studies of human placentae: Complement components in pre-eclamptic chorionic villi. *Clin. Exp. Immunol.* **56**, 175-184 (1984).
15. Huebner, R., Armstrong, D., Okuyan, M., Sarma, P. and Turner, H.: Specific complement-fixing viral antigens in hamster and guinea pig tumors induced by the Schmidt-Ruppin strain of avian sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 742-750 (1964).
16. Geering, G., Old, L. J. and Boyse, E. A.: Antigens of leukemia induced by naturally occurring murine leukemia virus, their relation to the antigens of Gross virus and other murine leukemia viruses. *J. Exp. Med.* **124**, 753-772 (1966).
17. Geering, G., Aoki, T. and Old, L. J.: Shared viral antigen of mammalian leukaemia viruses. *Nature* **226**, 265-266 (1970).
18. Gilden, R. V., Oroszlan, S. and Huebner, R. J.: Coexistence of intraspecies and interspecies specific antigenic determinants on the major structural polypeptide of mammalian C-type viruses. *Nature* **231**, 107-108 (1971).
19. Matsuda, H., Ikuta, K., Miyamoto, H. and Kato, S.: Antibody-induced redistribution of Marek's disease tumor-associated surface antigen (MATSA) on lymphoblastoid line (MSB-1) cells derived from Marek's disease lymphoma. *Biken J.* **20**, 35-37 (1977).
20. Yoshiki, T., Mellors, R. C. and Hardy, W. D. Jr.: Common cell-surface antigen associated with murine and feline C-type RNA leukemia viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 1878-1882 (1973).
21. Yoshiki, T., Mellors, R. C., Hardy, W. D. Jr. and Fleissner, E.: Common cell surface antigen associated with mammalian C-type RNA viruses.

- J. Exp. Med. **139**, 925-942 (1974).
22. Essex, M., Hardy, W. D. Jr., Cotter, S. M. and Jakowski, R. M.: Immune response of healthy and leukemic rats to the feline oncornavirus-associated cell membrane antigen. In: Ito, Y. and Dutcher, R. M.: Comparative Leukemia Research, 1973. Leukemogenesis. 483-488, Univ. of Tokyo Press, Tokyo (1975).
23. Vedbrat, S. S., Rasheed, S., Lutz, H., Gonda, M. A., Ruscetti, S., Gardner, M. B. and Prenskey, W.: Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen: A viral and not a cellularly coded transformation-specific antigen of cat lymphomas. Virology **124**, 445-461 (1983).
24. Levy, J. A.: C-type RNA viruses and autoimmune disease. In: Talal, N.: Autoimmunity. 404-456, Academic Press, New York, San Francisco, London (1977).
25. Okamoto, T., Tamura, T. and Takano, T.: Evidence in patients with systemic lupus erythematosus of the presence of antibodies against RNA-dependent DNA polymerase of baboon endogenous virus. Clin. Exp. Immunol. **54**, 747-755 (1983).
26. Sherr, C. J. and Todaro, G. J.: Primate type C virus p30 antigen in cells from humans with acute leukemia. Science **187**, 855-857 (1975).
27. Chandra, P., Steel, L. K., Laube, H. and Kornhuber, B.: Oncornaviral-like DNA polymerase activity in a case of childhood myelofibrotic syndrome. FEBS Lett. **58**, 71-75 (1975).
- 
- 別刷請求先:  
(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目  
札幌医科大学内科学第1講座 米沢和彦